

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

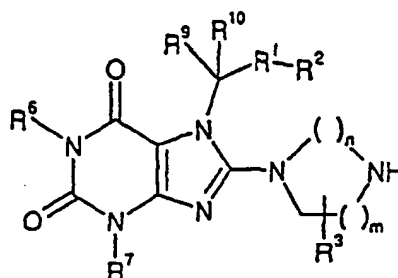
(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/02560 A3

- (51) International Patent Classification<sup>7</sup>: A61K 31/522, C07D 473/04, 473/06, 473/08
- (21) International Application Number: PCT/DK01/00467
- (22) International Filing Date: 4 July 2001 (04.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
PA 2000 01040 4 July 2000 (04.07.2000) DK  
60/223,240 4 July 2000 (04.07.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): NOVO NORDISK A/S [DK/DK]; Novo Allé, DK-2880 Bagsvaerd (DK).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): KANSTRUP, Anders, Bendtz [DK/DK]; Fredskovvej 7C, DK-3060 Espergårde (DK). CHRISTIANSEN, Lise, Brown [DK/DK]; Sophus Scandorphs Vej 4, DK-2800 Lyngby (DK). LUNDBECK, Jane, Marie [DK/DK]; Evas Alle 19, DK-2600 Glostrup (DK). SAMS, Christian, K. [DK/DK]; Jakob Dannefærdsvej 4A, 1, DK-1973 Frederiksberg C (DK). KRISTIANSEN, Marit [DK/DK]; Gustav Esmanns Allé 2, DK-2860 Søborg (DK).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report:  
25 April 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PURINE-2,6-DIONES WHICH ARE INHIBITORS OF THE ENZYME DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV (DPP-IV)



(57) Abstract: The present invention relates to therapeutically active and selective inhibitors of the enzyme DPP-IV, pharmaceutical compositions comprising the compounds and the use of such compounds for and the manufacture of medicaments for treating diseases that are associated with proteins which are subject to inactivation by DPP-IV, such as type 2 diabetes and obesity, as well as methods for treating diseases that are associated with proteins which are subject to inactivation by DPP-IV, such as type 2 diabetes and obesity.

WO 02/02560 A3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DK 01/00467

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 A61K31/522 C07D473/04 C07D473/06 C07D473/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>DATABASE STN INTERNATIONAL [Online] 04-07-2000 - 04-07-2001, retrieved from FILE REGISTRY XP002902159 see RN 335403-13-9, 333755-39-8, 333755-22-9, 333305-42-3, 333305-36-5, 333305-27-4, 333305-05-0, 332905-08-05, 332904-76-4, 332384-40-4, 332098-96-1, 331671-66-0, 331671-64-8, 329702-29-6, 318271-92-0, 313396-00-8, 313274-01-0, 313274-00-9, 313230-36-3, 304876-71-9, 303972 -96-5, 302777-00-0 abstract</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	<p>1,4-19, 21, 27-44, 46-54</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 November 2001

Date of mailing of the international search report

25. 02. 2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nebil Gecer

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter      nal Application No  
PCT/DK 01/00467

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DATABASE STN INTERNATIONAL [Online] 04-07- 2000 - 04-07-2001, retrieved from FILE REGISTRY, RN XP002902160 331841-51-1, 313554-09-5, 313530-91-5, 313530-90-4, 313273-71-1, 313255-35-5, 312915-48-3, 303973-85-5, 303973-23-1, 303971-30-4, 302800-67-5, 302777-10-2, 300391-56-4, 299421-57-1, 299419-33-3,	53
P,A	---	1
X	DATABASE STN INTERNATIONAL [Online] File CAPLUS, CAPLUS; accession no. 1987:95577, Document no. 106:95577, ROMANENKO N I ET AL: "Synthesis and biological activity of 3-methyl, 7-or 8-alkyl-, 7,8-dialkyl, heterocyclic, and cyclohexylaminoxanthines " XP002902161 abstract & FARM. ZH. , vol. 5, 1986, pages 41-44, Kiev	53
A	---	1
X	DATABASE STN INTERNATIONAL [Online] File CAPLUS, CAPLUS; accession no. 1970:55410, document no. 72:55410, K H KLEINE ET AL: "Synthesis of substituted bisxanthines" XP002902162 abstract & ARZNEIM. -FORSCH. , vol. 19, no. 11, 1969, pages 1854-1855, XP002902162	53
A	---	1
X	DATABASE STN INTERNATIONAL [Online] File CAPLUS, CAPLUS; accession no. 1969:459503, KUBOTA, KAZUHIKO ET AL: "Pharmacological studies of basic theophylline derivatives. I Effects on the cardiovascular system" XP002902163 document no. 71:59503 abstract & YAKUGAKU ZASSHI, vol. 89, no. 4, 1969, pages 441-445,	53
A	---	1
	--- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intel      onal Application No  
PCT/DK 01/00467

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE STN INTERNATIONAL [Online] File CAPLUS, CAPLUS; accession no. 1986:626150, , SAMURA B A ET AL: "Synthesis, neurotropic and diuretic activity of 7,8-disubstituted 3-methylxanthines" XP002902164 document no. 105:226150 abstract &amp; KHIM. -FARM. ZH. , vol. 20, no. 1, 1986, pages 52-55,</p>	53
A	---	1
X	<p>DATABASE STN INTERNATIONAL [Online] File CAPLUS, CAPLUS; accession no. 1975:80351, document no. 82:80351, GORCZYCA M ET AL: "Piperazine derivatives of methylxanthines. I. Chemical and pharmacological properties of 8-piperazinotheophyllines" XP002902165 abstract &amp; FARMACO, ED. SCI. , vol. 29, no. 10, 1974, pages 802-810,</p>	53
X	<p>DATABASE STN INTERNATIONAL [Online] File CAPLUS, CAPLUS; accession no. 1999:559580, HANS ZIMMER ET AL: "Synthesis of 8-substituted xanthines and their oxidative skeleton rearrangement to 1-oxo-2,4,7,9-tetraazaspiro (4,5)dec-2-ene-6,8,10-triones" XP002902166 document no. 131:351159 abstract &amp; EUR. J. ORG. CHEM. , vol. 9, 1999, pages 2419-2428,</p>	53
X	<p>DATABASE STN INTERNATIONAL [Online] File CAPLUS, CAPLUS; accession no. 1977:139992, GUTOROV L A ET AL: "1,8-Disubstituted derivatives of theobromine and their pharmacological activity" XP002902167 document no. 86:139992 abstract &amp; KHIM. FARM. ZH. , vol. 10, no. 12, 1976, pages 61-64,</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	53

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DK 01/00467

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE STN INTERNATIONAL [Online]  File CAPLUS, CAPLUS;  accession no. 1978:509376,  CYGANKIEWICS A ET AL: "Piperazine  derivatives of dimethylxanthines. V.  Preparation and properties of  8-piperazino- and 1-  beta.-hydroxypropyl-8-piperazinotheobromin  es"  XP002902168  document no. 89:109376  abstract  &amp; ACTA POL. PHARM.,  vol. 34, no. 6, 1977, pages 607-612,  ---</p>	53
X	<p>DATABASE STN INTERNATIONAL [Online]  File CAPLUS, CAPLUS;  accession no. 1998:260235 ,  KHALIULLIN F A ET AL: "Synthesis of  biologically active derivatives of  xanthine and benzimidazole"  XP002902169  document no 129:49337  abstract  &amp; BASHK. KHIM. ZH.,  vol. 4, no. 4, 1997, pages 59-62,  ---</p>	53
X	<p>DATABASE STN INTERNATIONAL [Online]  File CAPLUS, CAPLUS;  accession no. 1987:400259,  MARTINSON E A ET AL: "Potent adenosine  receptor antagonists that are selective  for the A1 receptor subtype"  XP002902170  document no. 107:259  abstract  &amp; MOL. PHARMACOL.,  vol. 31, no. 3, 1987, pages 248-252,  ---</p>	53
A	<p>DATABASE STN INTERNATIONAL [Online]  File CAPLUS, CAPLUS;  accession no. 1989:586916,  SKUL'SKAYA E A ET AL: "Poperties and  pharmacological action of derivatives of  7,8-disubstituted 3-methylxanthine and  6H-8-methylimidazo (1,2-f)xanthine"  XP002902171  document no. 111:186916  abstract  &amp; FARM. ZH.,  vol. 4, 1989, pages 34-39,  Kiev  ---</p>	1-54

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCI/DK 01/00467

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE STN INTERNATIONAL [Online]  File CAPLUS, CAPLUS;  accession no. 1997:297890,  MAZUR I A ET AL: "Synthesis and  antiphlogistic effect of some  7-substituted 8-(3,5-dimethyl-1-  pyrazolyl) theophyllines"  XP002902172  document no. 126:330513  abstract  &amp; FARM. ZH. ,  vol. 3, 1996, pages 82-84,  Kiev</p> <p>---</p>	1-54
A	<p>DATABASE STN INTERNATIONAL [Online]  File CAPLUS, CAPLUS;  accession no. 1983:539617,  GORCZYCA MARIA ET AL: "Synthesis and  properties of 7- and 8-piperaziny  derivatives of theophylline"  XP002902173  document no. 99:139617  abstract  &amp; ACTA POL. PHARM.,  vol. 39, no. 5-6, 1982, pages 315-321,</p> <p>---</p>	1-54
A	<p>WO 91 07945 A (LVMH RECH)  13 June 1991 (1991-06-13)  the whole document</p> <p>---</p>	1-54
A	<p>WO 92 05175 A (BEECHAM GROUP PLC)  2 April 1992 (1992-04-02)  the whole document</p> <p>-----</p>	1-54

SA 035268

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

01/10/01

International application No.

PCT/DK 01/00467

Patent document cited in search report			Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO	9107945	A1	13/06/91	AT	119027 T	15/03/95
				AU	650250 B	16/06/94
				AU	6745990 A	26/06/91
				DE	502043 T	25/02/93
				DE	69017467 D,T	19/10/95
				EP	0502043 A,B	09/09/92
				ES	2071836 T	01/07/95
				FR	2654935 A,B	31/05/91
				JP	5504129 T	01/07/93
				US	5470579 A	28/11/95
WO	9205175	A1	02/04/92	AU	653364 B	29/09/94
				AU	8541391 A	15/04/92
				CA	2092430 A	27/03/92
				EP	0550570 A	14/07/93
				GB	9020959 D	00/00/00
				IE	913350 A	08/04/92
				JP	6501251 T	10/02/94
				MX	9101237 A	04/05/92
				NZ	239921 A	23/12/93
				PT	99062 A	31/08/92
				ZA	9107610 A	30/09/92



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. März 2001 (01.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/14318 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C07C 237/00 (74) Anwälte: FORSTMAYER, Dietmar usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, 81541 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08118
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
20. August 2000 (20.08.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
199 40 130.6 24. August 1999 (24.08.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): PROBIODRUG GESELLSCHAFT FÜR ARZNEIMITTELFORSCHUNG MBH [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120 Halle (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DEMUTH, Hans-Ulrich [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120 Halle (DE). HOFFMANN, Torsten [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120 Halle (DE). SCHLENZIG, Dagmar [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06114 Halle (DE). HEISER, Ulrich [DE/DE]; Weinbergweg 22, 06120 Halle (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:  
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NEW EFFECTORS OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV FOR TOPICAL USE

(54) Bezeichnung: NEUE EFFEKTOREN DER DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV ZUR TOPISCHEN ANWENDUNG

|  
B (I)

(57) Abstract: The invention relates to compounds of general formula (I), wherein A represents an amino acid with at least one functional group in the side chain; while B is a chemical compound covalently bound to a functional group of the side chain of A, namely oligopeptide with a chain length of up to 20 amino acids with the exception of glycine homopolymers which have up to 6 glycine monomers or polyethylene glycols with molar masses of up to 20000 g/mole; C represents a thiazolidine, pyrrolidine, cyanopyrrolidine, hydroxyproline, dehydropyrolidine or piperidine group which is amide bonded. These compounds can be used to topically influence the activity of dipeptidyl Peptidase IV.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wobei A eine Aminosäure mit mindestens einer funktionellen Gruppe in der Seitenkette ist, B eine chemische Verbindung ist, die kovalent an eine funktionelle Gruppe der Seitenkette von A gebunden ist, nämlich Oligopeptide mit einer Kettenlänge von bis zu 20 Aminosäuren ausser Homopolymeren von Glycin aus bis zu 6 Glycinmonomeren oder Polyethylenglykole mit Molmassen von bis zu 20000 g/mol, C eine Thiazolidin-, Pyrrolidin-, Cyanopyrrolidin-, Hydroxyprolin-, Dehydropyrolidin- oder Piperidingruppe ist, die in Amidbindung mit A vorliegt. Diese Verbindungen können zur topischen Beeinflussung der Aktivität von Dipeptidyl Peptidase IV eingesetzt werden.

WO 01/14318 A2

5

## NEUE EFFEKTOREN DER DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV ZUR TOPISCHEN AN- WENDUNG

10

Die Erfindung betrifft neue Effektoren der Dipeptidyl Peptidase IV. Diese Effektoren können zur gezielten Beeinflussung lokal begrenzter pathophysiologischer und physiologischer Prozesse (Entzündungen, Chemotaxis, Autoimmunerkrankungen, Wundheilung) eingesetzt werden. Dabei werden die enzymatische Aktivität und die Bindungsaktivitäten der Dipeptidyl Peptidase IV und

15 von Enzymen mit vergleichbarer oder identischer Aktivität sowie von Proteinen mit verwandter Primärstruktur (z. B. FAP, Fibroblast Activation Protein (Levy et al., 1999)) mittels Effektoren (Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren, Antikörpern, Bindungsproteine, Bindungsantagonisten, Bindungsagonisten u.a.) beeinflusst.

20

Neben Proteasen, die in unspezifische Proteolyse einbezogen sind, was letztlich den Abbau von Proteinen zu Aminosäuren bewirkt, kennt man regulatorische Proteasen, die an der Funktionalisierung (Aktivierung, Deaktivierung, Modulierung) von endogenen Peptidwirkstoffen beteiligt sind (Kirschke *et al.*, 1995) Kräusslich and Wimmer, 1987). Insbesondere im Zusammenhang mit der Immunforschung und der Neuropeptidforschung sind eine Reihe solcher sogenannten

25 Konvertasen, Signalpeptidasen oder Enkephalinasen entdeckt worden (Gomez *et al.*, 1988)(Ansorge *et al.*, 1991).

30

Aufgrund der Häufigkeit des Vorkommens der Aminosäure Prolin in einer Vielzahl von Peptidhormonen und den damit verbundenen Struktureigenschaften dieser Peptide wird für prolin-spezifische Peptidasen eine den Signalpeptidasen analoge Funktion diskutiert (Yaron and Naider, 1993); (Vanhoof *et al.*, 1995). Dabei bestimmt Prolin in diesen Peptiden durch seine besondere Struktur sowohl Konformation als auch Stabilität dieser Peptide, indem es sie vor Abbau durch

unspezifische Proteasen schützt (Kessler, 1982). Enzyme, die dagegen hochspezifisch strukturverändernd auf Prolin-haltige Sequenzen einwirken (HIV-Protease, Cyclophylin u. a.) sind attraktive Ziele der aktuellen Wirkstoff-Forschung. Insbesondere für die nach dem Prolin spaltenden Peptidasen Prolyl Endopeptidase (PEP) und Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) konnten Beziehungen zwischen der Modulation der biologischen Aktivität von natürlichen Peptidsubstraten und deren selektiver Spaltung durch diese Enzyme wahrscheinlich gemacht werden. So nimmt man an, daß PEP eine Rolle beim Lernen bzw. im Gedächtnisprozeß spielt und DP IV in die Signalübertragung während der Immunantwort einbezogen ist (Ishiura *et al.*, 1989); (Hegen *et al.*, 1990).

- 10 DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität (z. B. besitzt die lysosomale DP II eine der DP IV nahezu identische Substratspezifität) kommt im Blutkreislauf sowie in nahezu allen Organen vor, wo sie hochspezifisch Dipeptide vom N-Terminus biologisch aktiver Peptide absplattet, wenn Prolin oder Alanin die benachbarten Reste der N-terminalen Aminosäure in deren Sequenz darstellen. Deshalb wird davon ausgegangen, daß dieses Enzym an der Regulation der biologischen Aktivität von Polypeptiden *in vivo* beteiligt ist (Vanhoof *et al.*, 1995).

- Kürzlich wurde gezeigt, daß eine Reihe von Chemokinen (RANTES, SDF-1 $\alpha$ , MDC, Eotaxin u.a.) Substrate der DP IV sind und diese durch DP IV in ihrer Funktion moduliert werden (Proost *et al.*, 1998; Proost *et al.*, 1998; Proost *et al.*, 1999); (Shioda *et al.*, 1998)). Chemokine sind durch ihre chemotaktische Wirkung wesentlich an der Regulation lokaler immunologischer Vorgänge, wie Autoimmunprozesse, Entzündungen und Wundheilung beteiligt (Nelson and Krensky, 1998). In neueren Arbeiten konnte von uns nachgewiesen werden, daß auch biologisch aktive Peptide mit Serin oder Threonin in P<sub>1</sub>-Position (Glukagon, VIP, PACAP) Substrate der DP IV darstellen.

- Eine Reihe von biologisch aktiven DP IV-Substraten (Substanz P, Somatostatin, VIP, PACAP u.a.) sind an der Regulation von neuronalen, immunologischen und vasoaktiven Prozessen in der Haut beteiligt (Scholzen *et al.*, 1998); (Wallengren, 1997). Die Dipeptidyl Peptidase IV stellt somit eine wichtige Schaltstelle bei der Regulation der Aktivität gastrointestinal, immunologisch bzw. neurologisch aktiver Peptide und damit ein interessantes therapeutisches Target dar (Augustyns *et al.*, 1999). Die genauen Signalkaskaden sind im einzelnen jedoch nicht vollständig aufgeklärt.

Genauere Kenntnisse existieren über die Rolle der DP IV bei der Regulation der Blutzuckers. Durch limitierte Proteolyse werden die Inkretine GIP<sub>1-4</sub> und GLP-1<sub>7-37</sub> inaktiviert. Eine Hem-

mung der Plasma-DP IV-Aktivität führt über eine verlängerte Aktivität der Inkretine und eine verstärkte Insulinfreisetzung zu einer Normalisierung des Blutzuckerspiegels (Demuth *et al.*, 1996; Pauly *et al.*, 1999; Pauly *et al.*, 1996).

Die Rolle die DP IV im Immunsystem ist noch nicht vollständig geklärt. Sie ist ein Aktivierungsmarker von T-Lymphozyten sowie ein Rezeptor für die Adenosindeaminase. Der Einsatz von DP IV-Inhibitoren hat in der Zellkultur und *in vivo* immunsuppressive Effekte (Ansorge *et al.*, 1995; Reinhold *et al.*, 1997; Kubota *et al.*, 1992). Mit monoklonalen Antikörpern gegen CD26 wurden zum Teil unabhängig von der enzymatischen Aktivität des Enzyms stimulatorische Effekte auf intrazelluläre Signalkaskaden ( $\text{Ca}^{2+}$ -influx, Kinaseaktivierungen) erzielt (Hegen *et al.*, 1993; Kameoka *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1993; Kähne *et al.*, 1995).

Aus der N-terminalen Sequenz der Substanz P abgeleitete Lysyl-Prolyl-Analoga zeigten einen fördernden Effekt auf die Wundheilung, der auf die Strukturähnlichkeit zu Substanz P zurückgeführt wird. Systemisch eingesetzte irreversible DP IV-Inhibitoren führten dagegen zu einer Hemmung der Wundheilung (Buntrock *et al.*, 1988; Kohl *et al.*, 1991; Kohl *et al.*, 1989).

Neben der Anwendung von DP IV-Inhibitoren zur Normalisierung der Blutglukose wurden DP IV-Inhibitoren bisher systemisch für die Behandlung von Arthritis im Tiermodell eingesetzt.

Bei Arthritis-Patienten sowie in tierischen Arthritismodellen wurde eine Verringerung der DP IV-Aktivität beobachtet (Küllertz and Boigk, 1986) (Fujita *et al.*, 1992). Insbesondere durch orale oder subkutane Applikation von systemisch wirkenden DP IV Inhibitoren wurde im Tiermodell eine Unterdrückung der Alkyldiamin-induzierten Arthritis erreicht (Tanaka *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1998).

Auch im Zusammenhang mit anderen Autoimmunerkrankungen wurde eine Wirkung durch DP IV-Inhibitoren erzielt. So konnte durch DP IV-Inhibierung eine Unterdrückung der Proliferation von ‚myelin basic protein‘-spezifischen T-Zell-Klonen erreicht werden (Reinhold *et al.*, 1998).

Bei verschiedenen Hautkrankheiten (Psoriasis, Lichen planus) und kanzerogenen Erkrankungen der Haut konnte eine erhöhte DP IV-Aktivität in Keratinozyten und Fibroblasten nachgewiesen werden (Novelli *et al.*, 1996) (Raynaud *et al.*, 1992). Auch das eng mit DP IV verwandte ‚fibroblast-activation protein‘, das ca. 50 % Sequenzhomologie zur DP IV aufweist und wahrscheinlich mit der durch Piñeiro-Sanchez *et al.*, 1997 beschriebenen Seprase identisch ist, wird verstärkt von inaktivierten Fibroblasten von Epithelkarzinomen und heilenden Wunden exprimiert (Niedermeyer *et al.*, 1998).

Auf Grund der weiten Verbreitung des Proteins im Organismus und der vielfältigen Mechanismen in die DP IV, DP IV-Aktivitäten und DP IV-verwandte Proteine involviert sind, kann eine systemische Therapie (enterale oder parenterale Applikation) mit DP IV-Inhibitoren zu einer Reihe unerwünschter Nebenwirkungen führen. So greift eine parenterale oder enterale Applikation von DP IV-Inhibitoren regulierend bzw. deregulierend in den Glukosestoffwechsel ein.

Es konnte nun gezeigt werden, daß Seitenketten-modifizierte Substrate des Enzyms Dipeptidyl Peptidase IV durch das Enzym erkannt und wie unmodifizierte Substrate gespalten werden können. (DEMUTH, H.-U., HEINS, J., 1995).

So konnte z.B. gezeigt werden, daß phosphorylierte Dipeptid-(B)-*p*-nitroanilide [KASPARI, A., et al., 1996] Substrate der DP IV sind. DP IV-Inhibitoren wie z.B. Glu(Gly)-Thia oder Lys(Z-NO<sub>2</sub>)-Thia [REINHOLD, D., et al., 1998] werden vollständig transportiert.

Die zu lösende Aufgabe bestand darin, Verbindungen herzustellen, die zur gezielten Beeinflussung lokal begrenzter pathophysiologischer und physiologischer Prozesse eingesetzt werden können. Insbesondere besteht die Aufgabe der Erfindung darin, eine lokal begrenzte Hemmung von DP IV bzw. DP IV-analoger Aktivität zu erzielen, um damit gezielt in die Regulation der Aktivität von lokal wirksamen Peptidhormonen eingreifen zu können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Bereitstellung von Verbindungen der allgemeinen Formeln A-C gelöst, wobei

|

B

A eine Aminosäure mit mindestens einer funktionellen Gruppe in der Seitenkette ist,

B eine chemische Verbindung ist, die kovalent an mindestens eine funktionelle Gruppe der Seitenkette von A gebunden ist, nämlich

- Oligopeptide mit einer Kettenlänge von bis zu 20 Aminosäuren, außer Homopolymeren von Glycin aus bis zu 6 Glycinmonomeren, oder
- Polyethylenglykole mit Molmassen von bis zu 20000 g/mol, und

C eine Thiazolidin-, Pyrrolidin-, Cyanopyrrolidin, Hydroxyprolin-, Dehydroprolin- oder Piperidingruppe ist, die in Amidbindung mit A vorliegt.

Insbesondere wird erfindungsgemäß mindestens eine pharmazeutische Zusammensetzung bereit-  
5 gestellt, die

mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formeln A-C, wobei



10

A eine Aminosäure, vorzugsweise eine  $\alpha$ -Aminosäure, besonders bevorzugt eine natürliche  $\alpha$ -Aminosäure mit mindestens einer funktionellen Gruppe in der Seitenkette, vorzugsweise Threonin, Tyrosin, Serin, Arginin, Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure oder Cystein ist,

15 B eine chemische Verbindung ist, die kovalent an mindestens eine funktionelle Gruppe in der Seitenkette von A gebunden ist, nämlich Oligopeptide mit einer Kettenlänge von bis zu 20 Aminosäuren, Polyethylenglykole mit Molmassen von bis zu 20000 g/mol, gegebenenfalls substituierte organische Amine, Amide, Alkohole, Säuren oder Aromaten mit 8 bis 50 C-Atomen,

20

C eine Thiazolidin-, Pyrrolidin-, Cyanopyrrolidin, Hydroxyprolin-, Dehydroprolin- oder Piperidingruppe ist, die in Amidbindung mit A vorliegt,

sowie

25

mindestens ein auf den Wirkort abgestimmtes übliches Adjuvans enthält.

Ferner werden derartige Verbindungen bzw. pharmazeutische Zusammensetzungen zur topischen Beeinflussung insbesondere der Verringerung der Aktivität von Dipeptidyl-Peptidase

30

IV oder analoger Enzyme verwendet.

In der gesamten Beschreibung und den Ansprüchen kann der Ausdruck "Alkyl" eine C<sub>1-50</sub> Alkylgruppe, bevorzugt eine C<sub>6-30</sub> Alkylgruppe, vorzugsweise eine C<sub>8-12</sub> Alkylgruppe darstellen; so kann eine Alkylgruppe z.B. eine Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Isopropyl- oder Butylgruppe sein;

- 5 ist der Ausdruck "Alk" z.B. in dem Ausdruck "Alkoxy" und der Ausdruck "Alkan" z.B. in dem Ausdruck "Alkanoyl" wie "Alkyl" definiert;

sind Aromaten bevorzugt substituierte oder gegebenenfalls unsubstituierte Phenyl-, Benzyl-, Naphthyl-, Biphenyl- oder Anthracengruppen, die vorzugsweise mindestens 8 C-Atome  
10 aufweisen;

kann der Ausdruck "Alkenyl" eine C<sub>2-10</sub> Alkenylgruppe, vorzugsweise eine C<sub>2-6</sub> Alkenylgruppe darstellen, die die Doppelbindung(en) an beliebiger Stelle aufweist und unsubstituiert oder substituiert sein kann;

15

kann der Ausdruck "Alkynyl" eine C<sub>2-10</sub> Alkynylgruppe, vorzugsweise eine C<sub>2-6</sub> Alkynylgruppe darstellen, die die Dreifachbindung(en) an beliebiger Stelle aufweist und unsubstituiert oder substituiert sein kann;

- 20 kann der Ausdruck "substituiert" oder Substituent eine beliebige Substitution durch eine oder mehrere, vorzugsweise eine oder zwei Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, ein- oder mehrwertige Acyl-, Alkanoyl-, Alkoxyalkanoyl- oder Alkoxyalkylgruppen darstellen; die vorstehenden Substituenten können wiederum eine oder mehrere, vorzugsweise jedoch keine, Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, ein- oder mehrwertige Acyl-, Alkanoyl-, Alkoxyalkanoyl- oder Alkoxyalkylgruppen als Seiten-  
25 gruppen aufweisen;

können organische Amine, Amide, Alkohole oder Säuren mit jeweils 8 bis 50 C-Atomen vorzugsweise mit 10 bis 20 C-Atomen die Formeln (Alkyl)<sub>2</sub>N- oder Alkyl-NH-, -CO-N(Alkyl)<sub>2</sub> oder -CO-NH(Alkyl), -Alkyl-OH oder -Alkyl-COOH aufweisen.

30

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können trotz verlängerter Seitenkettenfunktion noch an das aktive Zentrum des Enzyms Dipeptidyl Peptidase IV und analoger Enzyme binden, werden aber nicht mehr aktiv durch den Peptidtransporter PepT1 transportiert. Die daraus resultierende

verminderte bzw. stark eingeschränkte Transportfähigkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen führt in idealer Weise zu einer lokalen, topischen Inhibierung der DP IV und analoger Enzyme.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen bzw. erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen können als Racemate oder als enantiomerenreine Verbindungen, vorzugsweise in der L-threo- oder L-allo-Form, bezogen auf A, vorliegen bzw. verwendet werden. [Muß es hier nicht A heißen?]

Ein lokaler Eingriff in die Regulation von Peptidhormonen durch topische Applikation von spezifischen DP IV-Inhibitoren bietet damit die Möglichkeit, durch enterale oder parenterale Gabe von DP IV-Inhibitoren verursachte systemische Nebenwirkungen zu vermeiden, da nur eine lokal begrenzte Hemmung der DP IV-Aktivität stattfindet. Systemische Regulationsprozesse bzw. Regulationsprozesse in anderen Geweben bleiben weitestgehend unbeeinflusst, da eine schnelle systemische Verteilung dieser Verbindungen vermieden wird.

Durch Verlängerung / Vergrößerung der Seitenkettenmodifikationen z.B. über eine Kohlenstoffanzahl von sieben C-Atomen hinaus, kann erfindungsgemäß also eine dramatische Reduktion der Transportierbarkeit erzielt werden (Tabelle 1). Die Beispiele in Tabelle 1 zeigen deutlich, daß mit zunehmender räumlicher Grösse der Seitenketten die Transportfähigkeit der Substanzen abnimmt. Durch die räumliche und sterische Vergrößerung der Seitenketten z.B. über die Atomgruppengröße eines einfach substituierten Phenylrestes, Hydroxylaminrestes oder Aminosäurerestes hinaus, kann man erfindungsgemäß die Transportierbarkeit der Zielsubstanzen modulieren bzw. supprimieren.

Damit wird eine diskriminierende Beeinflussung der DP IV-Aktivität im lebenden Organismus ermöglicht.

Durch die Erfindung kann damit zum einen eine effektive Wirkung der Inhibitoren im zu behandelnden Gewebe erreicht werden, und zum anderen können durch lokal begrenzte, also topische Applikation von DP IV-Inhibitoren systemische Wirkungen der Inhibitoren weitestgehend vermieden werden. Damit wird eine effektive und nebenwirkungsarme Beeinflussung lokaler physiologischer und pathophysiologischer Prozesse (Entzündungen, Psoriasis, Arthritis, Autoimmunerkrankungen, Allergien) erreicht.



Die Erfindung stützt sich auf folgende Tatsachen:

- Enteral bzw. parenteral, d. h. oral bzw. *i.v.* oder subkutan verabreichte DP IV-Inhibitoren verteilen sich systemisch und hemmen die DP IV und analoge Aktivitäten im gesamten Organismus.
- 5     • Eine Reihe von bioaktiven Peptidsubstraten der DP IV sind dagegen in die Regulation lokaler Signalkaskaden involviert (Chemotaxis, Entzündungen, Neurotransmission).
- Überraschenderweise zeigen die erfindungsgemäßen seitenkettenmodifizierten DP IV-Inhibitoren eine hohe inhibitorische Potenz, werden aber kaum bzw. nicht absorbiert und transportiert und führen damit nicht zu nachweisbaren systemischen Effekten.
- 10   Die Erfindung stellt also neue DP IV-Inhibitoren und eine neuartige Herangehensweise für die Anwendung der DP IV- Inhibitoren *in vivo* bereit. Entsprechende Inhibitoren lassen sich durch chemische Modifizierungen bzw. Formulierungen auf die Art der Anwendung anpassen. So wird z.B. durch voluminöse hydrophile Substitutionen an der Seitenkette eine systemische Verteilung erschwert bzw. vermieden.
- 15   Die Inhibitoren können in pharmazeutischen und kosmetischen Präparaten verabreicht werden. Die topische Anwendung umfaßt dabei die lokale Anwendung der Inhibitoren durch direktes Aufbringen auf das zu behandelnde Gewebe (z.B. Haut, Wunden, Tumore) durch Salben, Cremes, Kosmetika, oder indirektes Aufbringen durch effektorhaltige Pflaster, Binden o. ä., durch Applikation in Körperteile (Mund, Nase, Ohren, Augen, Lunge) in Form von Tropfen,
- 20   Sprays, Inhalaten o. ä., durch direkte Injektion in oder um das zu behandelnde Gewebe und durch Implantation von effektorhaltigen Materialien. Die topische Anwendung umfaßt weiterhin die orale oder anale Applikation schwer- bzw. nichtabsorbierbarer Effektoren der Dipeptidyl Peptidase IV bzw. DP IV-analoger Sequenzen zur selektiven Beeinflussung der gastro-intestinalen DP IV.
- 25   Erfindungsgemäß werden insbesondere Verbindungen eingesetzt, in denen die Oligopeptide Kettenlängen von 3 bis 15, besonders bevorzugt von 4 bis 10 Aminosäuren aufweisen, und/oder die Polyethylenglykole mit Molmassen von mindestens 250 g/mol, vorzugsweise von mindestens 1500 g/mol und bis zu 15000 g/mol aufweisen, und/oder die gegebenenfalls substituierten organischen Amine, Amide, Alkohole, Säuren oder Aromaten mit mindestens 12 C-Atomen und vor-
- 30   zugsweise bis zu 30 C-Atomen aufweisen. Weiter werden pharmazeutische und kosmetische

Zusammensetzungen offenbart, die mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung gegebenenfalls in Kombination mit an sich üblichen Trägern oder Adjuvantien enthält.

- Die erfindungsgemäßen Verbindungen oder pharmazeutischen oder kosmetischen Zusammensetzungen können zur topischen Beeinflussung der Aktivität von Dipeptidylpeptidase IV oder analoger Enzyme, insbesondere zur Prophylaxe oder Therapie von Haut- oder Schleimhauterkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Entzündungen wie z.B. Psoriasis, Allergien, Arthritis, Tumoren oder Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden.
- 10 Die Verbindungen und pharmazeutischen oder kosmetischen Zusammensetzungen können als Salbe, Creme, Kosmetikum, Pflaster, Binde, Tropfen, Spray, Inhalat, Implantat oder Injektionslösung formuliert und eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Adjuvantien sind an sich bekannt.

- 15 Die Erfindung betrifft also die topische Anwendung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase IV sowie DP IV-analoger Enzymaktivitäten und DP IV-ähnlicher Proteine. Die topische Anwendung erlaubt eine lokale Modulation der Aktivitäten der obengenannten hochspezifischen Enzyme, die entscheidend an der Inaktivierung und Aktivierung biologisch aktiver Peptide (Chemokine, Substanz P, VIP, PHM, PACAP, Wachstumsfaktoren, u.a.) beteiligt sind.
- 20

- Damit ist ein gezieltes Eingreifen in lokale immunologische Prozesse (Chemotaxis, Entzündungsprozesse, Autoimmunerkrankungen) und eine wirksame und gezielte Behandlung damit verbundener pathophysiologischer und physiologischer Prozesse (Psoriasis, Parodontitis, Arthritis, Allergien, Entzündungen) möglich. Die Erfindung ermöglicht eine leichte Anwendbarkeit der Inhibitoren in hohen lokalen Konzentrationen.
- 25

Durch die geringe systemische Belastung mit den entsprechenden Effektoren wird eine Beeinflussung des Inkretinsystems sowie der systemischen Immunantwort vermieden.

## Ausführungsbeispiele

*Beispiel 1: Wirkung von seitenkettenmodifizierten Glutamylthiazolidinen als schwer transportierbaren DP IV-Inhibitoren*

- 5 Es wurden seitenkettenmodifizierte Glutamylthiazolidine der Struktur H-Glu(X)-Thia synthetisiert, wobei als X Polyethylenglycol oder Glycinoligomere verschiedener Kettenlänge verwendet wurden (Synthesebeschreibung siehe Methode A). Von diesen Derivaten wurden die Bindungseigenschaften am und die Transportfähigkeit durch den Peptidtransporter PepT1 untersucht sowie die  $K_i$ -Werte gegenüber DP IV bestimmt (Tabelle 1).
- 10 Überraschenderweise konnte festgestellt werden, daß die Seitenkettenmodifikationen die Bindungs-Eigenschaften an der Verbindung nur in geringem Maße verändern. Dagegen wird die Transportfähigkeit der Inhibitoren durch den Peptidtransporter durch die Seitenkettenmodifizierung drastisch herabgesetzt.
- Damit eignen sich diese DP IV-Inhibitoren hervorragend, um eine lokal begrenzte (topische)
- 15 Hemmung der DP IV im Organismus zu erreichen.

**Tabelle 1: Transportierbarkeit und Inhibitorkonstanten von ausgewählten DP IV-Inhibitoren.**

Verbindung	EC <sub>50</sub> (mM) <sup>1</sup>	I <sub>max</sub> (nA) <sup>2</sup>	K <sub>i</sub> (Mol/l) <sup>3</sup>
<i>Aminosäurethiazolidide</i>			
H-Ile-Thia	0,98	25 ± 8	1,3e-7 ± 11,1%
H-Glu-Thia	1,1	35 ± 13	6,1e-7 ± 11,4%
<i>Seitenkettenmodifizierte Glutamylthiazolidine</i>			
H-Glu(NHOH)-Thia	3,18	42 ± 11	1,7e-6 ± 8,6%
H-Glu(Gly <sub>3</sub> )-Thia	8,54	n.n. <sup>4</sup>	1,92e-7 ± 8,4%
H-Glu(Gly <sub>5</sub> )-Thia	>10	n.n. <sup>4</sup>	9,93e-8 ± 11,4%
H-Glu(PEG)-Thia	>10	n.n. <sup>4</sup>	3,11e-6 ± 9,8%

- 20 <sup>1</sup> Effektive Konzentrationen der Verbindungen, die die Bindung von <sup>3</sup>H-D-Phe-Ala (80mM) an PepT1-exprimierende *P. pastoris*-Zellen zu 50% inhibieren (EC<sub>50</sub>-Werte)
- <sup>2</sup> Transportverhalten an PepT1-exprimierenden Oocyten von *X. laevis* - mittels Zwei-Elektroden-Spannungclamp-Methode, I = durch den Transport generierte Einwärtsströme
- <sup>3</sup> Inhibitorkonstanten für die kompetitive Hemmung von gereinigter Nieren-DP IV durch die Beispielverbindungen
- 25 <sup>4</sup> nicht nachweisbar

*Beispiel 2: Effekt von oral applizierten DP IV-Inhibitoren auf Aktivität der Serum-DPIV*

Die Hemmung der Plasma DP IV (systemische Wirkung) wurde nach oraler Applikation von seitenkettenmodifizierten DP IV Inhibitoren (5µM/300mg Ratte) im Vergleich zu unmodifizierten Inhibitoren an gesunden Wistar-Ratten untersucht.

Obwohl die Inhibitoren annähernd gleiche  $K_i$ -Werte gegenüber DP IV besitzen (Tabelle 1) wird die Plasma-DP IV durch die neuartigen seitenkettenmodifizierten Inhibitoren deutlich langsamer und insgesamt wesentlich weniger gehemmt. Das heißt, daß diese Inhibitoren deutlich schlechter oder gar nicht aus dem Darm absorbiert werden. Insbesondere im Falle des Glu(Gly)<sub>5</sub>-Thia ist keine systemische Wirkung des oral applizierten Wirkstoffes nachweisbar.

Damit können diese Inhibitoren als Leitstruktur für die Synthese neuartiger topisch applizierbarer DP IV-Inhibitoren ohne systemische Wirkung fungieren.

*Beispiel 3: Synthese von seitenkettenmodifizierten Inhibitoren der DP IV***3.1 Synthese des Boc-Glu-Thia**

Umsetzung von Boc-Glu(OMe)-OH mit Thia\*HCl nach Methode B (Methoden siehe Abschnitt 3.4), Verseifung des Boc-Glu(OMe)-Thia nach Methode G

**Tabelle 2 Analytische Daten des Boc-Glu-Thia**

Verbindung	Summenformel $M_r$ Synthesemethode Ausbeute	MS $[M+H]^+$ DC:R <sub>f</sub> /System F <sub>p</sub>	$[\alpha]^{20}_D$ , Konzentration LM	Elementaranalyse (ber./gef.) %	HPLC R <sub>t</sub> [min]/System
Boc-Glu-Thia	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S 318,38 B + G 62%	319,5 0,52 / A <sup>1</sup> 0,42 / B <sup>1</sup> 115-118°C	-3,1 c = 1 Methanol	C:49,04/48,89 H:6,96/6,82 N:8,80/8,59	13,93 / A <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dünnschichtchromatographie

System A: Chloroform/Methanol 90:10

System B: Benzen/Aceton/Essigsäure 25:10:0,5

System C: n-Butanol/EE/Essigsäure/H<sub>2</sub>O 1:1:1:1

<sup>2</sup> HPLC-Trennbedingungen

Säule: Nucleosil C-18, 7µ, 250mm x 21mm

Eluent: Isokratisch, 40% ACN/Wasser/0,1% TFA

Fluß: 6ml/min

$\lambda$  = 220nm

### 3.2 Seitenkettenmodifizierte Boc-Glutamylthiazolidine

Boc-Glu-Thia wurde an der  $\gamma$ -Carbonsäurefunktion durch die Einführung verschieden großer Reste modifiziert. Diese Reste wurden über ihre Aminogruppe durch Ausbildung einer Amid-  
 5 bindung an die  $\gamma$ -Carbonsäurefunktion gekuppelt. Dabei kamen je nach Rest verschiedene Kupplungsverfahren zum Einsatz.

Folgende Aminokomponenten wurden mit der angegebenen Methode an Boc-Glu-Thia geknüpft:

Aminokomponente	Kupplungsmethoden (siehe Abschnitt 3.4)	Ausbeuten
Polyethylenglycolamin ( $M_r \approx 8000$ )	C	93%
H-Gly-Gly-Gly-OH	D + E	49%
H-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-OH	D + E	86%

Die Aufreinigung der Reaktionsprodukte weicht in 2 Fällen von der allgemeinen Synthesebe-  
 10 schreibung ab.

#### *Boc-Glu(Gly<sub>5</sub>)-Thia*

Das Produkt fällt bereits im Ansatz beim Rühren über Nacht aus, wird anschließend abfiltriert und mit 0,1n HCl und reichlich Wasser gewaschen. Danach wird es über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> i. Vak. getrocknet.

#### 15 *Boc-Glu(PEG)-Thia*

Abweichend von der allgemeinen Vorschrift werden die Ausgangsstoffe der Synthese in einem 500fachen Überschuß an DMF gelöst. Nach Reaktionsende wird das DMF i. Vak. vollständig entfernt und der Rückstand in viel Methanol gelöst. Nach Überschichtung mit Ether fällt das Produkt zusammen mit nicht umgesetztem PEG aus. Die Feinreinigung erfolgte durch präpara-  
 20 tive HPLC-Trennung an einer Gelfiltrationssäule (Pharmazia, Sephadex G-25, 90 $\mu$ m, 260mm-100mm).

Trennbedingungen: Eluent: Wasser, Fluß: 5ml/min,  $\lambda = 220\text{nm}$

Tabelle 3 Synthesedaten der seitenkettenmodifizierten Boc-Glutamylthiazolidine

Verbindung	Summenformel M <sub>r</sub> Ausbeute	MS [M+H] <sup>+</sup> DC/R <sub>f</sub> /System F <sub>p</sub>	[α] <sup>20</sup> <sub>D</sub> Kon-zen-tration LM	Elementaranalyse (ber./gef.) %	HPLC R <sub>i</sub> [min]/ System
Boc-Glu(Gly <sub>3</sub> )-Thia	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> S 489,54 49%	490,5		C:46,62 H:6,38 N:14,31	
Boc-Glu(Gly <sub>5</sub> )-Thia	C <sub>23</sub> H <sub>37</sub> N <sub>7</sub> O <sub>10</sub> S 603,64 86%	604,5 0,09 / C Zers. ab 202°C	n. b.	C:45,76/45,60 H:6,18/6,11 N:16,24/16,56	11,93 / A <sup>2</sup>
Boc-Glu(PEG)-Thia	93%	≈8000 (Massenschwerpunkt) 52-53°C	n. b.	n. b.	n.b.

<sup>2</sup> HPLC-Trennbedingungen

Säule: Nucleosil C-18, 7μ, 250mm x 21mm

5 Eluent: Isokratisch, 40% ACN/Wasser/0,1% TFA

Fluß: 6ml/min

λ = 220nm

### 3.3 Seitenkettenmodifizierte Glutamylthiazolidine

- 10 Von den in Tabelle 3 beschriebenen Verbindungen wurden nach Methode F die N-terminalen Boc-Schutzgruppen abgespalten. Die mit Gly-Derivaten modifizierten Substanzen wurden durch präparative HPLC-Trennung aufgereinigt, und liegen als Trifluoracetate vor. Das H-Glu(PEG)-Thia wurde wie die Boc-geschützte Vorstufe an einer Gelfiltrationssäule gereinigt.

Tabelle 4      Synthesedaten der seitenkettenmodifizierten Glutamylthiazolidine

Verbindung	Summenformel M <sub>r</sub> Ausbeute	MS [M+H] <sup>+</sup> DC/R <sub>f</sub> /Sys- tem F <sub>p</sub>	[α] <sup>20</sup> <sub>D</sub> , Kon- zentration LM	Elementaranalyse (ber./gef.) %	HPLC R <sub>t</sub> [min]/ System
H-Glu(Gly <sub>3</sub> )-Thia *TFA	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> SF <sub>3</sub> 503,45 94%	503,45 0,32 / C 91-94°C	+4,1 c = 1 Methanol	C:38,17/37,56 H:4,80/4,78 N:13,91/13,43	7,84 / C <sup>3</sup>
H-Glu(Gly <sub>5</sub> )-Thia *TFA	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> N <sub>7</sub> O <sub>10</sub> SF <sub>3</sub> 617,55 98%	617,55 0,25 / C 105-107°C	n. b.	C:38,90/38,82 H:4,90/4,79 N:15,88/15,39	8,22 / C <sup>3</sup>
H-Glu(PEG)-Thia *HCl	92%	≈8000 (Masse- schwer- punkt)	n. b.	n. b.	n. b.

<sup>3</sup> HPLC-Trennbedingungen

Säule: Nucleosil C-18, 7μ, 250mm x 21mm

Eluent: ACN/Wasser/0,1% TFA

Gradient: 20% ACN → 90% ACN in 30min

Fluß: 6ml/min

λ = 220nm

n.b. – nicht bestimmt oder nicht bestimmbar

### 3.4 Allgemeine Synthesevorschriften

*Methode A: Peptidbindungsknüpfung mittels Mischanhydridmethode mit CAIBE als Aktivierungsreagenz*

10mmol N-terminal geschützte Aminosäure bzw. Peptid werden in 20ml absolutem THF gelöst.

Die Lösung wird auf -15°C ± 2°C abgekühlt. Nacheinander werden unter Rühren je 10mmol N-MM und 10mmol Chlorameisensäureisobutylester zugegeben, wobei streng auf die Einhaltung des angegebenen Temperaturbereichs geachtet wird. Nach ca 6min werden 10mmol der Aminokomponente zugesetzt. Handelt es sich bei der Aminokomponente um ein Salz, wird der Reaktionsansatz anschließend mit weiteren 10mmol N-MM versetzt. Danach wird die Reaktionsmischung 2h in der Kälte und über Nacht bei RT gerührt.

Der Reaktionsansatz wird einrotiert, in EE aufgenommen, mit mit 5%iger KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung, gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über NaSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach der Entfernung des LM i. Vak. wird die Verbindung aus EE/Pentan umkristallisiert.

***Methode B: Peptidbindungsknüpfung mittels Mischanhydridmethode mit Pivalinsäurechlorid als Aktivierungsreagenz***

10mmol N-terminal geschützte Aminosäure bzw. Peptid werden in 20ml absolutem THF gelöst. Die Lösung wird auf 0°C abgekühlt. Nacheinander werden unter Rühren je 10mmol N-MM und  
5 10mmol Pivalinsäurechlorid zugegeben, wobei streng auf die Einhaltung des angegebenen Temperaturbereichs geachtet wird. Nach ca 6min wird der Ansatz auf -15°C abgekühlt und es werden nach Erreichen der tieferen Temperatur 10mmol der Aminokomponente zugesetzt. Handelt es sich bei der Aminokomponente um ein Salz, wird der Reaktionsansatz anschließend mit weiteren 10mmol N-MM versetzt. Danach wird die Reaktionsmischung 2h in der Kälte und über  
10 Nacht bei RT gerührt.

Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie bei *Methode A*.

***Methode C: Peptidbindungsknüpfung mit TBTU als Aktivierungsreagenz***

10mmol der N-terminal geschützten Aminosäure bzw. Peptid und 10mmol der C-terminal geschützten der Aminokomponente werden in 20ml absolutem DMF gelöst. Die Lösung wird auf  
15 0°C abgekühlt. Nacheinander werden unter Rühren je 10mmol DIPEA und 10mmol TBTU zugegeben. Der Ansatz wird eine Stunde bei 0°C und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Das DMF wird vollständig i. Vak. entfernt und das Produkt wie unter *Methode A* beschrieben aufgearbeitet.

20 ***Methode D: Darstellung eines Aktivesters (N-Hydroxysuccinimid-Ester)***

10mmol N-terminal geschützte Aminosäure bzw. Peptid und 10mmol N-Hydroxysuccinimid werden in 20ml absolutem THF gelöst. Die Lösung wird auf 0°C abgekühlt, und es werden  
10mmol Diyclohexylcarbodiimid unter Rühren zugegeben. Der Reaktionsansatz wird weitere 2h bei 0°C und anschließend bei RT über Nacht gerührt. Der entstandene N,N'-Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert, das LM i. Vak entfernt und das zurückbleibende Produkt aus EE/Pentan  
25 umkristallisiert.

***Methode E: Amidbindungsknüpfung mit N-Hydroxysuccinimid-Estern***

10mmol der C-terminal ungeschützten Aminokomponente werden in einer NaHCO<sub>3</sub>-Lösung  
30 (20mmol in 20ml Wasser) vorgelegt. Zu dieser Lösung werden bei RT unter Rühren langsam 10mmol des in 10ml Dioxan gelösten N-terminal geschützten N-Hydroxysuccinimidesters zuge-  
tropft. Der Reaktionsansatz wird weiter über Nacht gerührt und anschließend das Lösungsmittel



i. Vak. entfernt.

Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie bei *Methode A*

***Methode F: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe***

- 1mmol Boc-geschütztes Aminosäurepyrrolidid, -thiazolidid oder Peptid wird mit 3ml 1,1n HCl/Eisessig (*Methode F1*) oder 3ml 1,1n HCl/Dioxan (*Methode F2*) oder 3ml 50%ige TFA in DCM (*Methode F3*) versetzt. Die Abspaltung bei RT wird mittels DC verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion (ca 2h) wird die Verbindung als Hydrochlorid mit absolutem Diethylether ausgefällt, abgesaugt und i. Vak. über  $P_4O_{10}$  getrocknet. Das Produkt wird aus Methanol/Ether umkristallisiert oder umgefällt.

10 ***Methode G: Verseifung***

- 1mmol Peptidmethylester wird in 10ml Aceton und 11ml 0,1M NaOH-Lösung gelöst und bei RT gerührt. Der Verlauf der Verseifung wird mittels DC verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Aceton i. Vak. entfernt. Die verbleibende wässrige Lösung wird mit konzentrierter  $KH_2SO_4$ -Lösung bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 2-3 angesäuert. Anschließend extrahiert man das Produkt mehrmals mit EE und wäscht die vereinigten Essigesterfraktionen mit gesättigter NaCl-Lösung, trocknet über  $NaSO_4$  und entfernt i. Vak. das Lösungsmittel. Die Kristallisation erfolgt aus EE/Pentan.
- 15

**Abbildung 1:**

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der prozentualen Hemmung der Plasma-DP IV-Aktivität nach oraler Applikation von 5µMol Inhibitor pro 300g Ratte (n=2)

## Literaturverzeichnis

- 5     Ansorge, S., Schön, E., and Kunz, D. (1991). Membrane-bound peptidases of lymphocytes: functional implications. *Biomed.Biochim.Acta* **50**, 799-807.
- Ansorge, S., Bühling, F., Hoffmann, T., Kähne, T., Neubert, K., and Reinhold, D. (1995). *Dipeptidylpeptidase IV (CD26) in metabolism and the immune response* (Fleischer, B., Ed.) Springer-Verlag, Heidelberg. 163-184.
- 10    Augustyns, K., Bal, G., Thonus, G., Belyaev, A., Zhang, X. M., Bollaert, W., Lambeir, A. M., Durinx, C., Goossens, F., and Haemers, A. (1999). The unique properties of dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV/CD26) and the therapeutic potential of DPP IV inhibitors. *Curr Medicinal Chem* **6**, 311-327.
- Buntrock, P., Neubert, K., Kohl, A., Moch, C., Born, I., Demuth, H.-U., and Barth, A. (1988). Stimulation and inhibition of wound healing process using short-chain peptides.
- 15    *Biol.Zent.bl.* **107**, 87-92.
- Demuth, H.-U., Heins, J., On the catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV. in *Dipeptidyl Peptidase IV*, Fleischer, Ed., R.G.Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1, 1995.
- Demuth, H.-U., McIntosh, C. H. S., Rosche, F., Pauly, R. P., Pederson, R. A., and Schmidt, J. Verfahren zur Senkung des Blutglukosespiegels in Säugern. DE 196 16 486.9
- 20    Fujita, K., Hagihara, M., Nagatsu, T., Iwata, H., and Miura, T. (1992). The activity of dipeptidyl peptidase II and dipeptidyl peptidase IV in mice immunized with type II collagen. *Biochem.Med.Metab.Biol.* **48**, 227-234.
- Gomez, S., Gluschkof, P., Lepage, A., and Cohen, P. (1988). Relationship between endo- and exopeptidases in a processing enzyme system: activation of an endoprotease by the aminopeptidase B-like activity in somatostatin-28 convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5468-5472.
- 25    Hegen, M., Niedobitek, G., Klein, C.E., Stein, H., and Fleischer, B. (1990). The T cell triggering molecule Tp103 is associated with dipeptidyl aminopeptidase IV activity. *J.Immunol.* **144**, 2908-2914.
- Hegen, M., Mittrücker, H.-W., Hug, R., Demuth, H.U., Neubert, K., Barth, A., and Fleischer, B. (1993). Enzymatic activity of CD26 (dipeptidylpeptidase IV) is not required for its signalling function in T cells. *Immunobiol.* **189**, 483-493.
- Ishiura, S., Tsukahara, T., Tabira, T., and Sugita, H. (1989). Putative N-terminal splitting enzyme of amyloid A4 peptides is the multicatalytic proteinase, ingensin, which is widely distributed in mammalian cells. *FEBS Lett* **257**, 388-392.
- 35    Kameoka, J., Sato, T., Torimoto, Y., Sugita, K., Soiffer, R.J., Schlossman, S.F., Ritz, J., and Morimoto, C. (1995). Differential CD26-mediated activation of the CD3 and CD2 pathways after CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **85**, 1132-1137.

- Kähne, T., Neubert, K., and Ansorge, S. (1995). Enzymatic activity of DPIV / CD26 is involved in PMA-induced hyperphosphorylation of p56<sup>lck</sup>. *Immunol.Lett.* 46, 189-193.
- 5 Kaspari, A., Diefenthal, T., Grosche, G., Schierhorn, A., Demuth, H.-U., Substrates containing phosphorylated residues adjacent to proline decrease cleavage by proline-specific peptidases, *Protein Struct Mol Enzym*, 147, 1996
- Kessler, H. (1982). Konformation und biologische Wirkung von zyklischen Peptiden. *Angew. Chem.* 94, 509
- Kirschke, H., Barrett, A.J., and Rawlings, N.D. (1995). Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile* 2, 1581-1643.
- 10 Kohl, A., Volk, H.D., Diezel, W., Buntrock, P., and Diamantstein, T. (1989). The dipeptide Lys-Pro restores the diminished wound healing following treatment with anti-T-helper cell monoclonal antibody. *Int.J.Immunopharmacol.* 11, 237-240.
- Kohl, A., Volk, H.D., Buntrock, P., Kohl, G., Diamantstein, T., and von Baehr, R. (1991). The role of dipeptidylpeptidase IV positive T cells in wound healing and angiogenesis.
- 15 *Agents Actions* 32, 125-127.
- Kräusslich, H.-G. and Wimmer, E. (1987). Viral Proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 701
- Kubota, T., Flentke, G.R., Bachovchin, W.W., and Stollar, B.D. (1992). Involvement of dipeptidyl peptidase IV in an in vivo immune response. *Clin.Exp.Immunol.* 89, 192-197.
- Küllertz, G. and Boigk, J. (1986). Dipeptidyl peptidase IV activity in the serum and synovia of patients with rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 45, 52-56.
- 20 Levy, M.T., McCaughan, G.W., Abbott, C.A., Park, J.E., Cunningham, A.M., Müller, E., Rettig, W.J., Gorell, M.D., Fibroblast Activation Protein: A Cell Surface Dipeptidyl Peptidase and Gelatinase Expressed by Stellate Cells at the Tissue Remodelling Interface in Human Cirrhosis *Hepatology*, 29, 1999, 1768-1778.
- 25 Nelson, P.J. and Krensky, A.M. (1998). Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around, comes around. *Curr Opin Immunol* 10, 265-270.
- Niedermeyer, J., Enenkel, B., Park, J. E., Lenter, M., Rettig, W. J., Damm, K., and Schnapp, A. (1998). Mouse fibroblast-activation protein - Conserved Fap gene organization and biochemical function as a serine protease. *Eur J Biochem* 254, 650-654.
- 30 Novelli, M., Savoia, P., Fierro, M. T., Verrone, A., Quaglino, P., and Bernengo, M.G. (1996). Keratinocytes express dipeptidyl-peptidase IV (CD26) in benign and malignant skin diseases. *Br J Dermatol* 134, 1052-1056.
- 35 Pauly, R. P., Demuth, H. U., Rosche, F., Schmidt, J., White, H. A., Lynn, F., McIntosh, C. H. S., and Pederson, R. A. (1999). Improved glucose tolerance in rats treated with the dipeptidyl peptidase IV (CD26) inhibitor ile-thiazolidide. *Metabolism* 48, 385-389.
- Pauly, R. P., Rosche, F., Wermann, M., McIntosh, C. H. S., Pederson, R. A., and Demuth, H. U. (1996). Investigation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide-(1-42) and gluca-

gon-like peptide-1-(7-36) degradation in vitro by dipeptidyl peptidase IV using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry - A novel kinetic approach. *J Biol Chem* 271, 23222-23229.

- 5 Proost, P., De Meester, I., Schols, D., Struyf, S., Lambeir, A.M., Wuyts, A., Opdenakker, G., De Clercq, E., Scharp □ S., and Van Damme, J. (1998a). Amino-terminal truncation of chemokines by CD26/dipeptidyl-peptidase IV. Conversion of RANTES into a potent inhibitor of monocyte chemotaxis and HIV-1-infection. *J Biol Chem* 273, 7222-7227.
- 10 Proost, P., Struyf, S., Schols, D., Durinx, C., Wuyts, A., Lenaerts, J.P., De Clercq, E., De Meester, I., and Van Damme, J. (1998b). Processing by CD26/dipeptidyl-peptidase IV reduces the chemotactic and anti-HIV-1 activity of stromal-cell-derived factor-1alpha. *FEBS Lett* 432, 73-76.
- 15 Proost, P., Struyf, S., Schols, D., Opdenakker, G., Sozzani, S., Allavena, P., Mantovani, A., Augustyns, K., Bal, G., Haemers, A., Lambeir, A.M., Scharp □ S., Van Damme, J., and De Meester, I. (1999). Truncation of macrophage-derived chemokine by CD26/ dipeptidyl-peptidase IV beyond its predicted cleavage site affects chemotactic activity and CC chemokine receptor 4 interaction. *J Biol Chem* 274, 3988-3993.
- Raynaud, F., Bauvois, B., Gerbaud, P., and Evain Brion, D. (1992). Characterization of specific proteases associated with the surface of human skin fibroblasts, and their modulation in pathology. *J.Cell.Physiol.* 151, 378-385.
- 20 Reinhold, D., Bank, U., Buhling, F., Tager, M., Born, I., Faust, J., Neubert, K., and Ansorge, S. (1997). Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) induces secretion of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in stimulated mouse splenocytes and thymocytes. *Immunol Lett* 58, 29-35.
- 25 Reinhold, D., Hemmer, B., Gran, B., Born, I., Faust, J., Neubert, K., McFarland, H. F., Martin, R., and Ansorge, S. (1998). Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV/CD26 suppress activation of human MBP-specific CD4+T cell clones. *J Neuroimmunol* 87, 203-209.
- Reinhold D., Hemmer, B., Steinbrecher, A., Born, I., Faust, J., Neubert, K., Brocke, S., Martin, R., Ansorge, S., Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26): Role in T cell activation and autoimmune disease. *Biol. Chem.* 379, S 69, 1998.
- 30 Scholzen, T., Armstrong, C.A., Bunnett, N.W., Luger, T.A., Olerud, J.E., and Ansel, J.C. (1998). Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol* 7, 81-96.
- 35 Shioda, T., Kato, H., Ohnishi, Y., Tashiro, K., Ikegawa, M., Nakayama, E.E., Hu, H., Kato, A., Sakai, Y., Liu, H., Honjo, T., Nomoto, A., Iwamoto, A., Morimoto, C., and Nagai, Y. (1998). Anti-HIV-1 and chemotactic activities of human stromal cell-derived factor 1alpha (SDF-1alpha) and SDF-1beta are abolished by CD26/dipeptidyl peptidase IV-mediated cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6331-6336.
- 40 Tanaka, T., Kameoka, J., Yaron, A., Schlossman, S.F., and Morimoto, C. (1993). The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90, 4586-4590.

- Tanaka, S., Murakami, T., Horikawa, H., Sugiura, M., Kawashima, K., and Sugita, T. (1997). Suppression of arthritis by the inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *Int J Immunopharmacol* **19**, 15-24.
- 5 Tanaka, S., Murakami, T., Nonaka, N., Ohnuki, T., Yamada, M., and Sugita, T. (1998). Anti-arthritic effects of the novel dipeptidyl peptidase IV inhibitors TMC-2A and TSL-225. *Immunopharmacology* **40**, 21-26.
- Vanhoof, G., Goossens, F., De Meester I, Hendriks, D., and Scharpe, S. (1995). Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.* **9**, 736-744.
- Wallengren, J. (1997). Vasoactive peptides in the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc* **2**, 49-55.
- 10 Yaron, A. and Naider, F. (1993). Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol.* **28(1)**, 31-38.

### Patentansprüche

1. Verbindung der allgemeinen Formel A-C, wobei
- 5
- |  
B
- A eine Aminosäure mit mindestens einer funktionellen Gruppe in der Seitenkette ist,
- B eine chemische Verbindung ist, die kovalent an mindestens eine funktionelle Gruppe der
- 10 Seitenkette von A gebunden ist, nämlich
- Oligopeptide mit einer Kettenlänge von bis zu 20 Aminosäuren außer Homopolymeren von Glycin aus bis zu 6 Glycinmonomeren oder
  - Polyethylenglykole mit Molmassen von bis zu 20000 g/mol,
- 15
- C eine Thiazolidin-, Pyrrolidin-, Cyanopyrrolidin-, Hydroxyprolin-, Dehydroprolin- oder Piperidingruppe ist, die in Amidbindung mit A vorliegt.
2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß A eine  $\alpha$ -Aminosäure ist.
- 20
3. Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß A eine natürliche  $\alpha$ -Aminosäure ist.
4. Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Amino-
- 25 säure Threonin, Tyrosin, Serin, Arginin, Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure oder Cystein ist.
5. Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligopeptide Kettenlängen von 3 bis 15 Aminosäuren aufweisen.
- 30
6. Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligopeptide Homopolymere, Copolymere oder Blockcopolymere sind.

7. Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Polyethylenglykole Molmassen von mindestens 250 g/mol aufweisen.
- 5 8. Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß C eine Thiazolidin-, Pyrrolidin-, oder Cyanopyrrolidingruppe ist.
9. Pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche gegebenenfalls in Kombination mit an sich üblichen Trägern oder Adjuvantien enthält.
- 10 10. Kosmetische Zusammensetzung, die eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 gegebenenfalls in Kombination mit an sich üblichen Trägern oder Adjuvantien enthält.
11. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder pharmazeutischen oder kosmetischen Zusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche zur topischen Beeinflussung der Aktivität von Dipeptidyl-Peptidase IV oder analoger Enzyme.
- 15 12. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder pharmazeutischen oder kosmetischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Prophylaxe oder Therapie von Haut- oder Schleimhauterkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Entzündungen.
- 20 13. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder pharmazeutischen oder kosmetischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Prophylaxe oder Therapie von Entzündungen, Psoriasis, Allergien, Arthritis, Tumoren oder Autoimmunerkrankungen.
- 25 14. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder pharmazeutischen oder kosmetischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 als Salbe, Creme, Kosmetikum, Pflaster, Binde, Tropfen, Spray, Inhalat, Implantat oder Injektionslösung.

15. Pharmazeutische Zusammensetzung, die

mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formeln A-C, wobei



A eine Aminosäure mit mindestens einer funktionellen Gruppe in der Seitenkette ist,

10 B eine chemische Verbindung ist, die kovalent an mindestens eine funktionelle Gruppe in der Seitenkette von A gebunden ist, nämlich Oligopeptide mit einer Kettenlänge von bis zu 20 Aminosäuren, Polyethylenglykole mit Molmassen von bis zu 20000 g/mol, gegebenenfalls substituierte organische Amine, Amide, Alkohole, Säuren oder Aromaten mit 8 bis 50 C-Atomen,

15 C eine Thiazolidin-, Pyrrolidin-, Cyanopyrrolidin-, Hydroxyprolin-, Dehydroprolin- oder Piperidingruppe ist, die in Amidbindung mit A vorliegt,

sowie

20 mindestens ein auf den Wirkort abgestimmtes übliches Adjuvans enthält.

16. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß A eine  $\alpha$ -Aminosäure ist.

25 17. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß A eine natürliche  $\alpha$ -Aminosäure ist.

18. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäure Threonin, Tyrosin, Serin, Arginin, Lysin, Asparaginsäure,  
30 Glutaminsäure oder Cystein ist.

19. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligopeptide Kettenlängen von 3 bis 15 Aminosäuren aufweisen.



20. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligopeptide Homopolymere, Copolymere oder Blockcopolymere sind.
- 5 21. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Polyethylenglykole Molmassen von mindestens 250 g/mol aufweisen.
22. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß C eine Thiazolidin-, Pyrrolidin,- oder Cyanopyrrolidingruppe ist.
- 10 23. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Salbe, Creme, Kosmetikum, Pflaster, Binde, Tropfen, Spray, Inhalat, Implantat oder Injektionslösung eingesetzt wird.
- 15 24. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß sie in Kombination mit an sich üblichen Trägern eingesetzt wird.
25. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 24 zur topischen Beeinflussung der Aktivität von Dipeptidyl-Peptidase IV oder analoger
- 20 Enzyme.
26. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 24 zur Prophylaxe oder Therapie von Haut- oder Schleimhauterkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Entzündungen.
- 25 27. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15 bis 24 zur Prophylaxe oder Therapie von Entzündungen, Psoriasis, Parodontitis, Allergien, Arthritis, Tumoren oder Autoimmunerkrankungen.

1/1

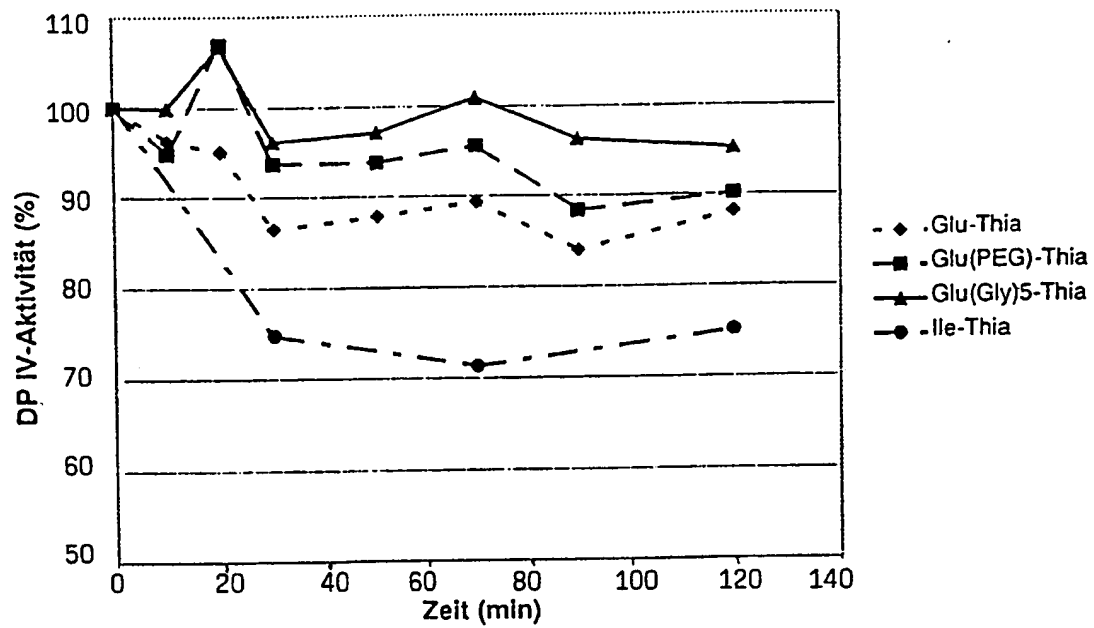


Fig. 1: Systemische Wirkung oral applizierter DP IV-Inhibitoren an gesunden Wistar-Ratten.